

Emlősspermiumok vizsgálata domén-specifikus fluoreszcens jelöléssel

Zárójelentés, 2005-2006

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

1. Elhalt sejtek akroszóma-státuszának összehasonlító vizsgálata konvencionális fénymikroszkópos és fluoreszcens tesztekkel

A fluoreszcens tesztek kontrolljaként alkalmazandó tripánkék-Giemsa festék (Kovács-Foote, 1992, Nagy et al., 1999) tapasztalataim szerint jellemzően nagyon kevés olyan elhalt spermiumot jelez, amelynek ép az akroszómája, míg a fluoreszcens mikroszkóppal, illetve flow citométerrel értékelhető FITC-PNA/PI festékkombináció (Nagy et al., 2003) alkalmazásával az elhalt sejtek mintegy fele jellemzően ép jelet ad. Az ellentmondás mértékének vizsgálatára 60 méréspárt végeztem a fenti módszerekkel mélyhűtött-felolvasztott bikasperma mintákon, amelyeken az elhalt sejtek akroszóma-státuszát (intakt vagy sérült) osztályoztam. A méréspárokat Bland-Altman (1982) statisztikai módszere szerint értékeltem. Eredményeim szerint a méréspárok átlagos különbsége $d = -54,64\%$, szórása $SD = 8,65\%$ volt, ami a két módszer eredményeinek azonosságát erősen megkérdőjelezi. Mivel a FITC-PNA az egyik legérzékenyebb akroszóma-specifikus próba, amely béta-galaktozidáz specifikus kötődéssel szinte a membránfúziós pórusok megjelenésekor jelzi az akroszóma reakciót, a PI pedig egy DNS-specifikus membrán-impermeabilis festék, amely csak a sérült sejtmembránon képes áthatolni, ezt a festékkombinációt megbízhatónak tartom, míg a konvencionálisan alkalmazott tripánkék-Giemsa kombináció eredménye – legalábbis az elhalt spermiumok értékelése szempontjából - megkérdőjelezhető, mivel ezek a festékek empirikusak, kötődési mechanizmusuk nem ismert pontosan.

2. Spermiumok élő-elhalt státuszának automatizált fluoreszcens értékelése

A pályázati tervben eredetileg egy excel-makro segítségével terveztem a zöld (élő) és vörös (elhalt) ondósejtek arányának automatizált megállapítását, azonban a rendelkezésemre álló kombinált fluoreszcens szűrő nem adott egyenletes intenzitású vörös és zöld jelet, a külön-külön, zöld és vörös szűrővel felvett digitális fényképek utólagos, szoftveres

összeszerkesztése az automatizált értékeléshez túl lassú lett volna, éppen ezért nem lett volna gyakorlatias. Ehelyett egy holland mesterséges termékenyítő állomás rutin spermaboratóriumában üzembe helyezett flow citométer alkalmazhatóságát teszteltem, különös tekintettel arra, hogy mennyire illeszthető a napi rutin munkarendbe. Tíz holstein-fríz bika két-két ejakulátumát vizsgáltuk. Az ejakulátumok az adott mesterséges termékenyítő állomás rutin technológiája szerint kerültek feldolgozásra és fagyasztásra TRIS-homogenizált tojássárgája hígítóban. Felolvasztás után (egy perc 37°C-os vízfürdőben, az állomás rutin technológiája szerint) minden egyes ejakulátumból három-három almintát vettünk, ezek négy-négy műszalma keverékéből álltak. Az almintákat két ismétlésben vizsgáltuk.

Egyfelől az állomáson rutinszerűen használt, fluoreszcens mikroszkópos Hoechst 33258 festést alkalmaztuk (de Leeuw et al., 1991). Ezzel a módszerrel a kombinált fáziskontraszt-fluoreszcens mikroszkóppal értékelve az élő sejtek nem jelölődnek, az elhalt sejtek kéken fluoreszkálnak. Másfelől flow citométerrel Gardner et al. (1994) módszerét alkalmaztuk (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, L-7011 SYBR-14/PI, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), amelyben az élő ondósejtek zölden fluoreszkálnak (SYBR 14), az elhaltak vörösen (PI). Mikroszkóppal mintánként 200-200, flow citométerrel 10000 – 10000 sejtet értékeltünk. Eredményeink szerint a mikroszkópos és a flow citométeres vizsgálatok megfelelő egyezést mutattak, azonban a flow citométeres módszer ismételhetősége, következésképpen precizitása – a nagyobb értékelt sejtszámnak köszönhetően – jóval nagyobb volt. Mindemellett, a minták előkészítése, fluoreszcens jelölése, inkubációja, a műszer beállítása és a teszt lefuttatása nem vett több időt igénybe, mint a rutinszerűen alkalmazott mikroszkópos értékelés, tehát illeszthető a napi labormunkarendbe. Amennyiben a flow citométer-gyártók felismerik ennek a piacnak a jelentőségét, és olcsóbb műszerekkel jelennek meg (vannak erre utaló jelek), úgy a citometria kiemelkedő mérési precizitásával új távlatokat nyithat meg a rutin spermaminőség-ellenőrzés előtt.

3. Sejtszerv-specifikus fluoreszcens próbák tesztelése

A vizsgálatokhoz mélyhűtött/felolvasztott bikaspermát használtam, 100 μ l-t hígítva 900 μ l PBS-ben.

A hígított mintákhoz adtam a fluoreszcens próbákat, majd a mintákat 37°C fokon inkubáltam 30 percig.

MITOTRACKER GREEN FM (M-7514, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

A mitokondriumok aktivitásának mérésére a MitoTracker Green FM próbát választottam, mivel ez a festék rövidebb inkubációs időt igényel és kisebb háttérfluoreszcenciát ad, mint a többi, konvencionális mitokondrium-specifikus próba, mint pl. a Rodamin 123 (Garner, személyes közlés). A festék élénkzöld fluoreszcens jelet ad a mitokondriumokon. A próba nem fluoreszkál vizes oldatban, csak akkor, ha a mitokondriumok lipid állományában akkumulálódik. A próba a peptidek és fehérjék tiol-csoportjához kötődik (Molecular Probes online Handbook). A forgalmazó 20-200 nM munkaoldat-koncentrációt javasol általánosságban. Ezen belül széles koncentráció-skálát próbáltam ki, de minden esetben azt tapasztaltam, hogy a festék minden egyes mitokondriumot jelöl, függetlenül annak aktív vagy inaktív állapotától, emellett nem specifikusan kötődött az akroszómához és a flagellumhoz is, illetve a spermahígítóban lévő tojássárgája-szemcsékhez is, ami eleve értelmetlenné teszi a flow citométeres alkalmazást.

LYSOTRACKER RED DND 99 (L-7528, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

A LysoTracker próbák olyan acidotróp fluoreszcens próbák, amelyek az acidikus sejtszervek jelölésére alkalmasak. Thomas et al. (1997) a LysoTracker Green DND 26 zölden emittáló próbát alkalmazták spermiumok akroszóma-integritásának mérésére. A multikolor megközelítésnek megfelelően narancs emissziójú próbát kerestem, ezért esett választásom a fenti próbára. A forgalmazó 50-75 nM munkaoldat-koncentrációt javasol általánosságban. Spermiumokon 50 és 500 nM közötti koncentrációkat teszteltem, de egy esetben sem kaptam mikroszkóppal detektálható jelet. A próba előnye az lett volna, hogy az ép akroszómát jelöli, ellentétben a hasonló emissziós spektrumú PE-PNA-val, amelyet korábban már sikerrel alkalmaztunk spermiumokon (Nagy et al., 2003).

SYTO 17 (S-7579, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

A SYTO festékek membrán-permeábilis nukleinsav-specifikus próbák. A SYTO 17 festéket a konvencionálisan alkalmazott, zöld jelet adó SYBR 14 kiváltására teszteltem, hogy a zöld színt a multikolor megközelítésben a mitokondriumok értékelésére használhassam. A forgalmazó általánosságban 10 nM - 5 μ M munkaoldat-koncentrációt javasol állati sejtek vizsgálatára. Elfogadható jelet kaptam 2,5 μ M koncentráció mellett. A SYBR 14-el való előzetes összehasonlításaim szerint (0, 50 és 100% arányú, fagyasztva elölt spermiumok értékelésével) a SYTO 17 ígéretes próba az élő sejtek jelölésére multikolor festékkombinációban.

TO-PRO 3 (T-3605, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

A TO-PRO 3 monomer cianin nukleinsav-próba, amely nem membránpermeábilis, így csak a nekrotikus spermiumokat jelöli. Kedvezőbb excitációs és emissziós spektruma miatt választottam elhalt sejt-specifikus kontrasztfestékként a konvencionális propidium-jodid helyett. 0,5 μ M koncentrációval elfogadható fluoreszcens jelet kaptam, előzetes tesztjeim szerint a PI-val azonos eredményt ad a próba.

4. Fluoreszcens domén-specifikus plazmamembrán-integritási teszt kidolgozása

4.1. A farki rész plazmamembrán-integritásának értékelése anti-tubulin antitest segítségével.

Tekintve, hogy tubulin a spermiumok farki részének alkotója, elképzelésem szerint anti-tubulin antitesteket alkalmazva a farki rész plazmamembránjának sérülése kimutatható, mivel az antitestek – előzetes permeabilizálás hiányában – csak a sérült membránon juthatnak át, és adhatnak fluoreszcens jelet, az intakt membránnal bíró ondósejtek jelöletlenek maradnak.

A vizsgálatban anti-bovin, alfa-tubulin monoklonáris egér antitestet (A11126, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, primer próba) és AlexaFluor 488 FluoroNanogold kecske anti-egér IgG-t (A24920, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, szekunder próba) alkalmaztam. Mivel a forgalmazó által biztosított használati ismertető szerint az adott alkalmazáshoz empirikusan kell meghatározni a próbák alkalmazott koncentrációit, inkubációs időket, stb., a primer próba 6, a szekunder próba 3 különböző koncentrációjának kombinációját vizsgáltam, az optimális jelölési protokoll kidolgozása érdekében:

Primer: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 4 μ g/ml PBS-ben oldva

Szekunder: 1,5; 3; 8 μ g/ml PBS-ben oldva.

Friss ménspermamintákat PBS-ben hígítottam 1millió/ml végkoncentrációra és ehhez adtam a próbákat a fenti koncentrációk kombinációiban. A primer hozzáadása után egy órát inkubáltam a mintákat szobahőn, majd a nem kötött próbákat kimostam. A szekunder hozzáadása után újabb 30 perc inkubáció következett szobahőn, majd 2 x mosást és reszuszpendálást követően DAPI kontrasztfestéket és antifade lefedőt alkalmazva keneteket készítettem, amelyeket fluoreszcens mikroszkóppal értékeltem.

Vizuálisan értékelve a legegységelműbb jelölést a 2 ug/ml primer és 3 ug/ml szekunder kombinációjával értem el (1. fotó), azonban ez a jel is gyenge volt a rutinszerű fluoreszcens mikroszkópos alkalmazáshoz, továbbá a jelölési protokoll viszonylagos bonyolultsága és időigényessége is azt a következtetést támasztotta alá, hogy bár kutatási célokra érdemes lehet az anti-tubulin jelölés alkalmazását figyelembe venni, a rutin spermaminőség-ellenőrzés szempontjából egyszerűbb módszerre van szükség.

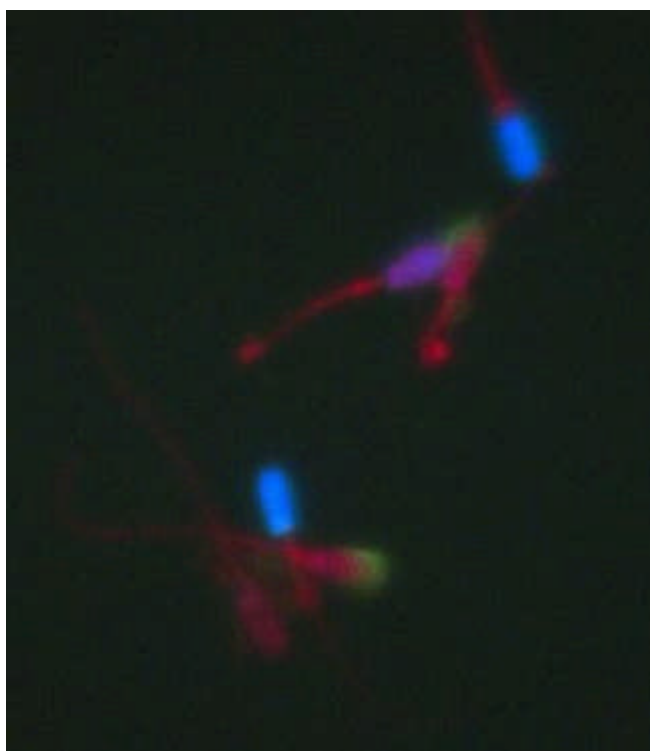


1. fotó. Anti-tubulin antitest (zöld) segítségével jelölt, hajtűszerűen hajlott farkú ménondósejt, sérült farki plazmamembránnal (kontrasztfesték: DAPI - kék)

4.2. Konvencionális fénymikroszkópos festékek fluoreszcens mikroszkópos alkalmazása a farki rész plazmamembrán-integritásának értékelésére

A fent említett anti-tubulin antitest olcsó, könnyen hozzáférhető alternatívájaként a következő konvencionális fénymikroszkópos vitális festékeket teszteltem a fluoreszcens értékelés szempontjából: tripánkék, kongóvörös és Chicago Sky Blue (Sigma-Aldrich). Kék

gerjesztőfény mellett mindhárom festék vörös fluoreszcenciát mutatott, a legegységelműbb jelet a Chicago Sky Blue adta, így a továbbiakban ezt alkalmaztam festékkombinációkban. A vizsgálatokhoz mélyhűtött-felolvasztott bikaspermát alkalmaztam, amelyet PBS-ben történő mosás után a jövőbeni flow citométeres vizsgálatok szempontjából optimális, kb. 5 millió/ml sejtkoncentrációra állítottam be PBS-ben reszuszpendálva a centrifugálás (200 x g, 10 perc) után, a felülúszó eltávolítása után maradó pelletet. A sejtszuspenzióhoz Chicago Sky Blue 0,16%-os oldatából (Kútvölgyi et al., 2006) 10 ul-t, FITC-PNA-ból 5 ul-t (Nagy et al., 2003), kontrasztfestékként Hoechst 33342-ből 2 ul-t (Hallap et al., 2006) adtam, majd 10 perc inkubációt követően fluoreszcens mikroszkóppal értékeltem (2. fotó).



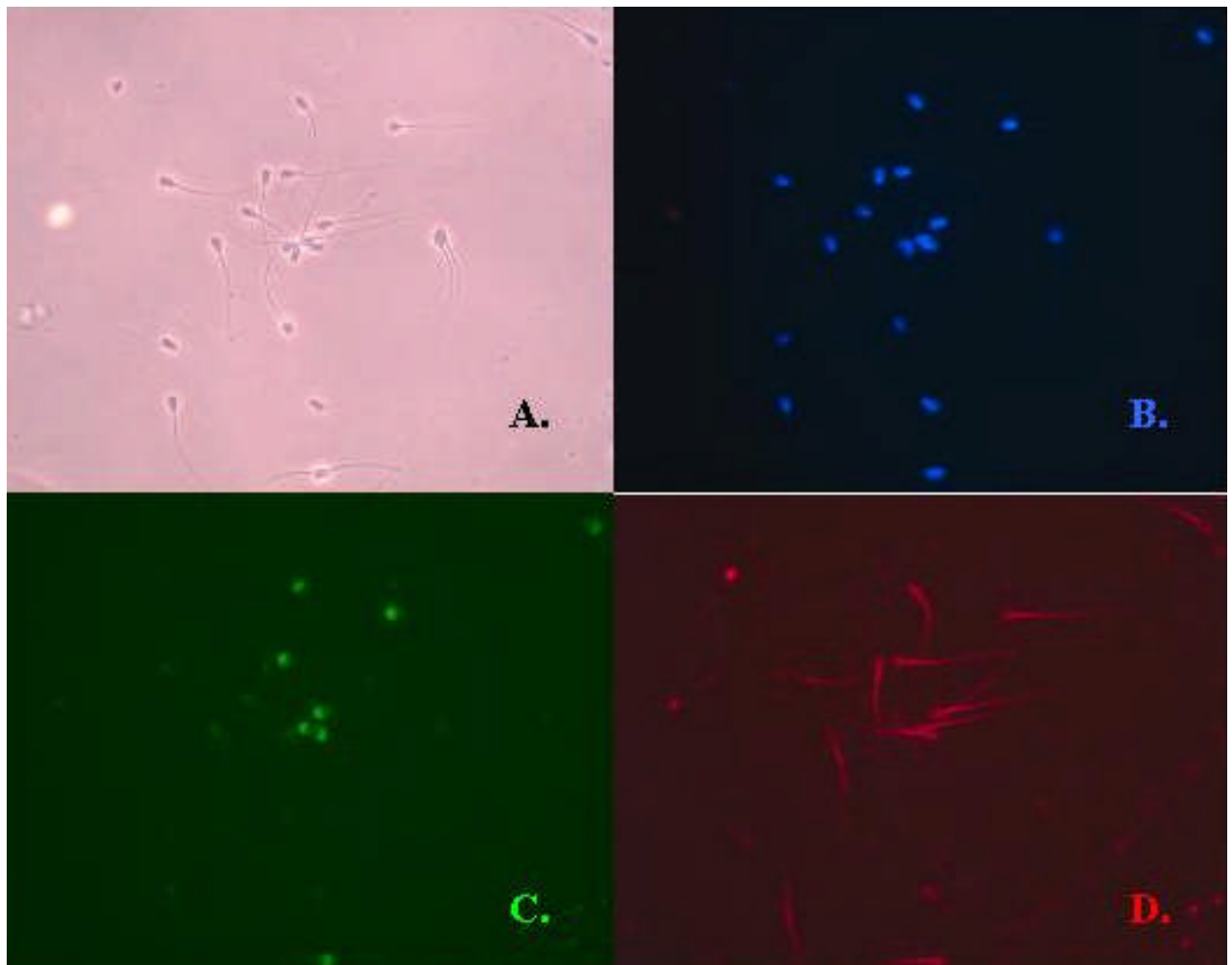
2. fotó. Chicago Sky Blue/FITC-PNA/Hoechst 33342 festékkombináció. A sérült plazmamembránt a Chicago Sky blue vörös színnel jelzi a farki részen, a feji részen ez a Hoechst kontrasztfesték miatt lilás színnel jelentkezik. A sérült akroszómát a FITC-PNA zöld színnel jelzi.

A tapasztalataim azt mutatták, hogy a Chicago Sky Blue jelölési intenzitása a megismételt vizsgálatok során erősen változó volt, gyakran nehezen értékelhetőnek bizonyult, és mivel a jelölési mechanizmusa nem ismert pontosan (fehérje-specifikus, de pontosabban nem meghatározott), célszerűnek láttam más, specifikusabb fluoreszcens próbák tesztelését is.

4.3. LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit

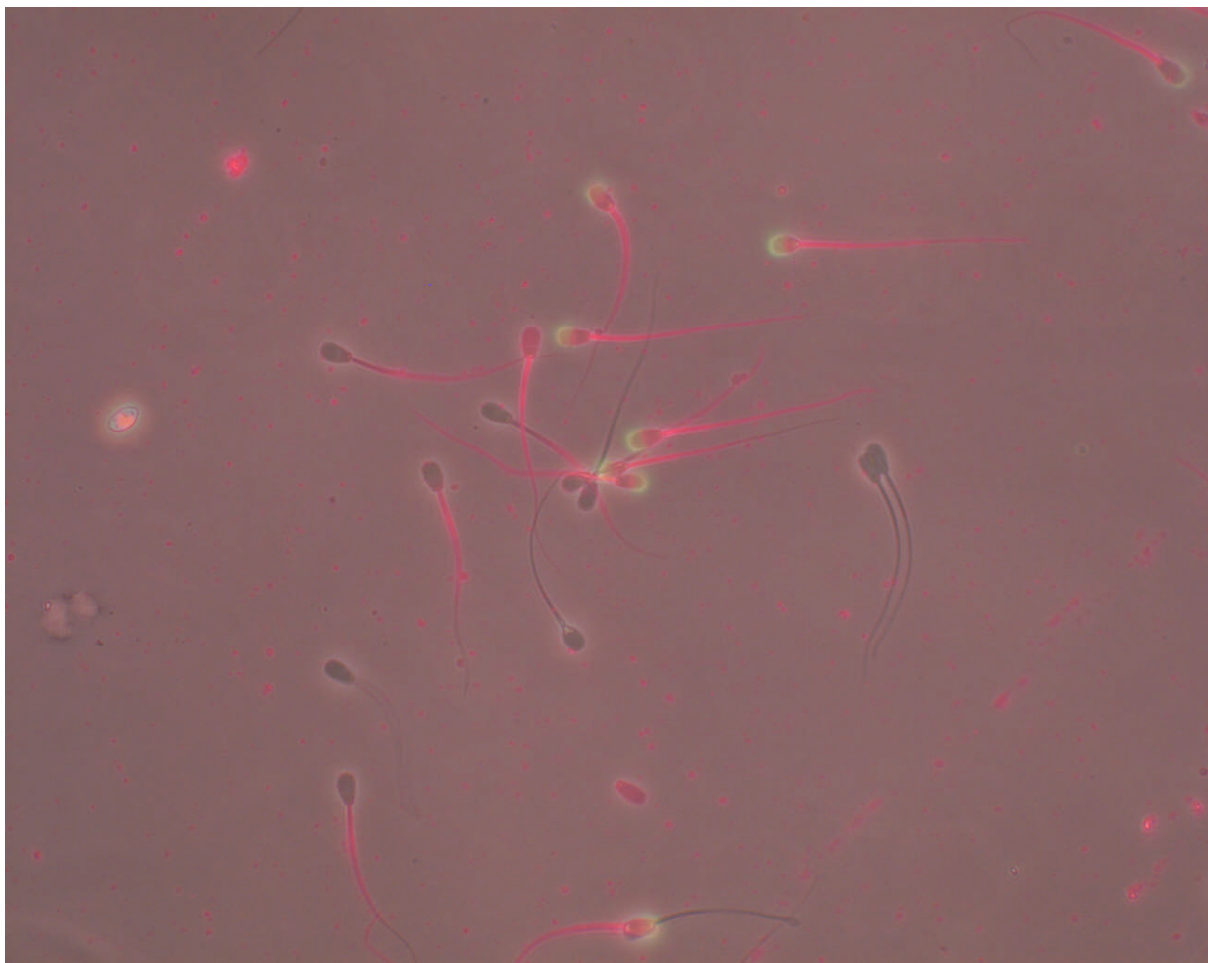
A Molecular Probes (Eugene, OR, USA) fent nevezett kit-jei olyan amin-specifikus vitális fluoreszcens festékek, amelyek az élő sejtek plazmamembránjának külső rétegéhez, az elhalt sejtek plazmamembránjának mind külső, mind belső rétegéhez kötődnek, így az élő sejteket gyenge, az elhalt sejteket erősebb fluoreszcenciával jelzik. Ez a flow citométeres munka során lehet előnyös, ugyanis így csak egy fluoreszcens detektorra van szükség az élő-elhalt státusz értékeléséhez. Ezeket a festékeket spermiumok vizsgálatára még nem alkalmazták. Vizsgálataimban a kit vörös jelet adó változatát (L23102) alkalmaztam, de kipróbáltam a kék (L23105) és zöld jelet (L23101) adó változatait is. A fentiekhez hasonlóan, a vizsgálatokhoz mélyhűtött-felolvasztott bikaspermát alkalmaztam, amelyet PBS-ben történő mosás után kb. 5 millió/ml sejtkoncentrációra állítottam be PBS-ben reszuszpendálva a centrifugálás (200 x g, 10 perc) után, a felülúszó eltávolítása után maradó pelletet.

A festés során kisebb módosításokkal követtem a kit-hez mellékelt jelölési protokollt. Az 5 millió/ml sejtkoncentrációjú szuszpenzióhoz 5 µl LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability próbát adtam, majd 30 percig inkubáltam sötétben, szobahőn. Az inkubáció 20. percében 2 µl Hoechst 33342-t (Hallap et al., 2006) és 5 µl Alexa Fluor 488 PNA-t (a FITC-PNA-hoz hasonlóan jelölő, spermiumokon még nem alkalmazott lektint, amely azonban jóval nagyobb fotostabilitással bír, így lassabban fakul ki a mikroszkópos értékelés alatt) adtam a mintához. A 30 perces inkubációt követően a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal értékeltem (3. fotó).

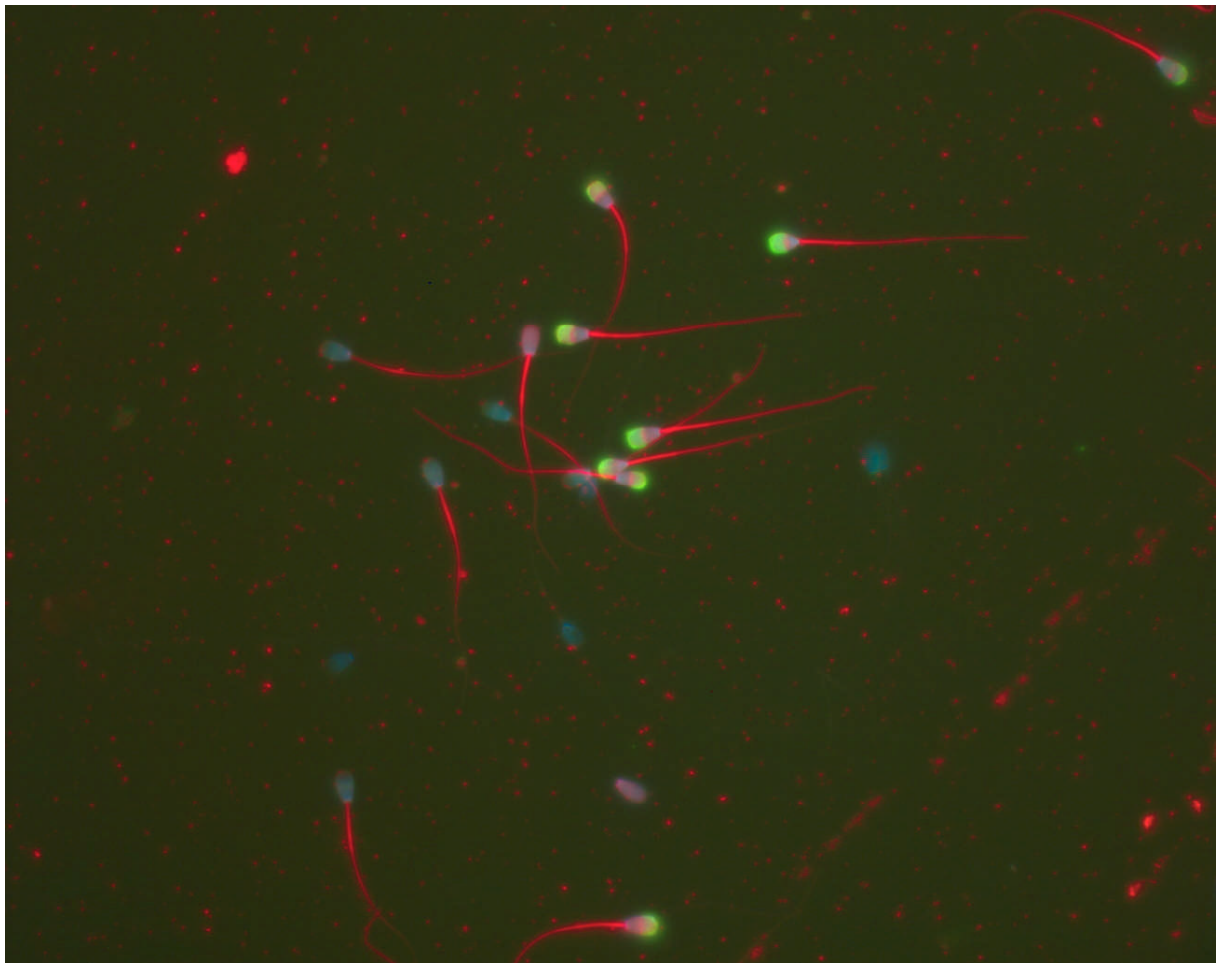


3. fotó. LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit (vörös), Hoechst 33342 (kék), Alexa Fluor 488 PNA (zöld). Ugyanazon mikroszkópos mező fáziskontrasztal (A), kék szűrővel (B), zöld szűrővel (C) és vörös szűrővel (D) értékelve. A Hoechst 33342 kék színnel jelzi a DNS-t tartalmazó spermumfejeket mind az élő, mind az elhalt sejtek esetében (B). Az Alexa Fluor 488 PNA zöld színnel jelzi a sérült vagy levált akroszómát, az ép akroszómájú sejtek jelöletlenek maradnak (C). A LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit az ép plazmamembránt – mind a feji, mind a farki részen – szemmel nem észlelhető intenzitással jelzi, a sérült membránt viszont intenzív vörös jellel mutatja mind a feji, mind a farki részen (D).

Az egyes szűrőkkel készült digitális felvételeket utólag szoftver segítségével összeillesztettem (4., 5. fotó).



4. fotó. Fáziskontraszt, LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit (vörös), Alexa Fluor 488 PNA (zöld). Megfelelő fluoreszcens szűrőkkel értékelve ez a kombináció Hoechst kontrasztfesték nélkül alkalmazható mikroszkópos értékelésre: az ép plazmamembránnal bíró, fluoreszcens jelet nem mutató sejtek fáziskontraszttal észlelhetők, a sérült vagy levált akroszóma zöld fluoreszcens jelet ad, a sérült plazmamembrán mind a feji, mind a farki részen értékelhető a vörös fluoreszcens jel alapján.

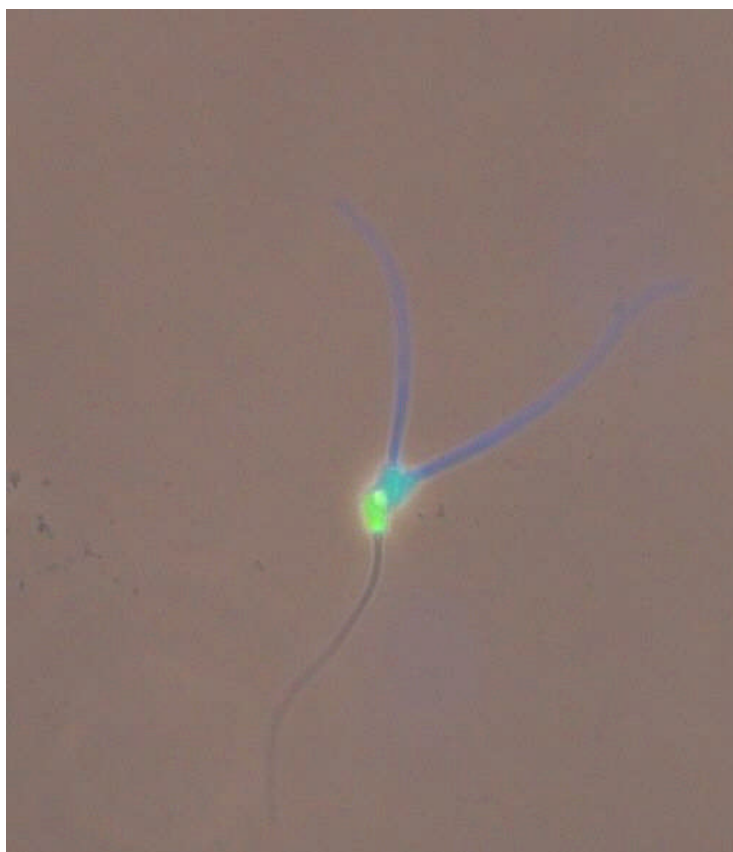


5. fotó. LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit (vörös), Hoechst 33342 (kék), Alexa Fluor 488 PNA (zöld). Flow citométeres értékelés esetén a biztos ondósejt – spermiumhígító megkülönböztetés (Nagy et al., 2003) érdekében ajánlott a Hoechst 33342 kontrasztfesték alkalmazása is. Ebben az esetben az ép plazmamembránnal bíró spermiumok kék jelet mutatnak a fejen, a farkok nem jelölődik, a sérült vagy levált akroszóma zöld, a sérült plazmamembrán a feji részen kék és vörös (mikroszkóppal értékelve lila), a farki részen vörös.

Ez a festékkombináció korábban még nem került alkalmazásra spermiumok vizsgálatára. Mivel egyértelmű, specifikus fluoreszcens jeleket ad, igény szerint külön-külön, illetve a fentiekben ismertetett módon kombinációban is alkalmazható, a pályázat célkitűzéseit sikerült megvalósítani. A fenti kombináció elvileg kisebb módosításokkal tovább bővíthető egy mitokondriális aktivitás értékelésére alkalmas fluoreszcens próbával, a MitoTracker Deep Red 633-al (Hallap et al., 2005) is, azonban ennek tesztelésére nem volt lehetőségem a megfelelő fluoreszcens szűrő hiánya miatt. Elvileg azonban a kék LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit, a Hoechst 33342-höz hasonlóan minden ondósejt DNS-ét jelölő SYBR 14

kontrasztfesték, a sérült vagy levált akroszómát a zöld FITC-PNA-hoz hasonlóan, de narancs színnel jelölő PE-PNA (Nagy et al., 2003) és a fent említett MitoTracker Deep Red 633 (az aktív és inaktív mitokondriumokat eltérő intenzitású vörös színnel megkülönböztető próba, Hallap et al., 2005) értékelhető lehet egy megfelelő többlézeres flow citométer (pl. BD LSR) segítségével.

A rendelkezésemre álló fluoreszcens szűrőkkel értékeltem a kék LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit, és a SYBR 14 kontrasztfesték alkalmazhatóságát is (6. fotó).



6. fotó. Fáziskontraszt, LIVE/DEAD Reduced Biohazard Viability Kit (kék), SYBR 14 (zöld). Az ép feji plazmamembránt a zöld szín jelzi, a farki rész nem festődött. A sérült feji és farki plazmamembránt a kék szín jelzi.

A festékkombináció minden eddig tesztnél árnyaltabb képet adhat a vizsgált spermaminták minőségéről. Ez egyfelől pontosabb minőségellenőrzést tehet lehetővé a mesterséges termékenyítő állomások spermlaboratóriumaiban, másfelől az alkalmazott kutatás eszközeként is előnyös lehet új spermamélyhűtési technológiák kidolgozása során.

A kidolgozott fluoreszcens festékkombinációt a továbbiakban az Intézetünkben futó, és más intézményekkel együttműködésben végzett spermium-mélyhűtési kísérleteinkben

(ménsperma, szarvas-sperma, stb.) kívánjuk alkalmazni, illetve nemzetközi együttműködésben szeretnénk tovább vizsgálni a flow citométeres alkalmazhatóságát is.

A pályázat témájához kapcsolódóan a közeljövőben a következő tudományos közleményeket nyújtom be közlésre az alábbi tudományos folyóiratoknak:

1. A critical comment on the interpretation of the results of the simultaneous viability-acrosome integrity assay by a trypan blue-Giemsa staining - Theriogenology
2. Comparison of light microscopic and flow cytometric analyses of bull sperm quality under routine conditions - Theriogenology
3. Bikaspermiumok vizsgálata domén-specifikus fluoreszcens jelöléssel – Magyar Állatorvosok Lapja

Irodalom

Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet i:307-310 (1986).

Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium idoide. J. Androl. 1994;15: 620-629.

Hallap T., Nagy Sz., Håård M., Jaakma Ü., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed bull spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. Therio, 63: 2311-2322 (2005).

Hallap T., Nagy Sz., Jaakma Ü., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. Therio, 65:1122-1136 (2006).

Kovács A. and Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. Biot Histoc 67:119-124 (1992).

Kútvölgyi G, Stefler J, Kovács A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. Biotech Histochem 81:109-117 (2006).

de Leeuw J, den Daas JHG and Woelders H. The fix-vital stain method; simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. J Androl 12:112-118 (1991)

Nagy Sz., Házás G, Bali Papp Á, Iváncsics J, Szász F, Szász F Jr. , Kovács A and Foote RH. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Therio* 52:1153-1159 (1999).

Nagy Sz., Jansen J., Topper E.K. and Gadella B.M. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. *Biol Reprod*, 68:1828-1835 (2003).

Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM and Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 56:991-998 (1997).